台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 63(4):307–319 (2014)
DOI: 10.6156/JTAR/2014.06304.07

新型綠螢光基因 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 在水稻之表現、評估與應用

王怡雯 [1]　賴慧真 [2]　謝曉鶯 [2]　王強生 [3,*]　林大鈞 [4,*]

摘要

王怡雯、賴慧真、謝曉鶯、王強生、林大鈞。2014。新型綠螢光基因 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 在水稻之表現、評估與應用。台灣農業研究 63(4):307–319。

高效率、無害的基因表現篩選系統為所有作物基因轉殖必須克服的問題，爰此本研究建構新型 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 報導基因表現系統，並於水稻進行基因功能評估。首先完成 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP 表現載體之構築，利用農桿菌媒介轉形法，將螢光基因導入水稻基因組。結果發現，兩轉殖系經感染癒傷組織，培養 14 d 後，即可觀察到綠色螢光。而 T1 種子於無菌播種 14 d 後，*35S*::*AcGFP* 轉殖系可在幼苗的胚盤及根部等組織觀察到綠色螢光；*35S*::*ZsGFP* 轉殖系也可在幼苗的胚盤及胚乳表面糊粉層等組織觀察到綠色螢光。然而，兩轉殖系幼苗的芽鞘及幼葉可能因葉綠素的干擾，無法觀察到綠色螢光。此外，*35S*::*AcGFP* 轉殖系各組織的螢光表現皆高於 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系，可能肇因於 *35S*::*ZsGFP* 系統的表現效率低所致。以 *AcGFP* 分析玉米 *Ubi-1* 及水稻 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子活性，結果發現 *Ubi-1*::*AcGFP* 轉殖系在感染癒傷組織及發芽芽體，均可觀察到螢光表現；而 *GluB5*::*AcGFP* 及 *GluC*::*AcGFP* 轉殖系亦可在感染癒傷組織及發芽芽體觀察到螢光。這些結果顯示，玉米 *Ubi-1*、水稻 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子皆可在水稻細胞中驅動 *AcGFP* 表現，生產具有功能的螢光蛋白質。本研究所建構的這些綠螢光基因表現載體系統，應可作為植物基因轉殖的早期篩選標誌，應用於協助較具挑戰性之植物轉殖平台的建立，亦可作為其它重要基因與啟動子的功能分析。

關鍵詞：綠螢光基因、報導基因、啟動子、表現系統、農桿菌媒介轉形、水稻。

前言

水母綠螢光蛋白質 (jellyfish green fluorescent protein; GFP) 因在藍色波長範圍 (470–490 nm) 光線的激發下，會發出綠色螢光而得名。其在植物轉殖或是基因功能評估等試驗，已成為一種非常有效的標示工具並被廣泛應用 (Bolhassani *et al*. 2011)。尤其，綠螢光蛋白質具有對細胞不易產生毒害及物理性破壞，且無需添加反應基質即可直接於活細胞中觀察等優點 (Errampalli *et al*. 1999)，因此，已逐漸取代 β- 葡糖苷酸酶 (β-glucuronidase; *GUS*) 或螢光素酶 (luciferase) 基因，被廣泛應用在各種植物相關的研究 (Stewart 2001)。

Niedz *et al*. (1995) 成功地在甜橙 (*Citrus sinensis* L.) 原生質體中表現野生型 *Aequorea GFP* 基因。同時，該基因也成功於玉米原生質體被表現，然而卻無法在阿拉伯芥 (*Arabidopsis*) 及菸草的細胞中被表達 (Hu & Cheng 1995)。在當時，學者認為強效的啟動子與激

投稿日期：2014 年 8 月 4 日；接受日期：2014 年 10 月 14 日。
[*] 通訊作者：wangchansen@nchu.edu.tw 及 dagin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
[3] 國立中興大學農藝系副教授兼系主任。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

發光源強度及來源，是綠螢光基因表現系統在植物系統應用的重要關鍵因子 (Hu & Cheng 1995; Sheen *et al*. 1995)。

綠螢光基因雖然已於植物細胞中被成功地表現，然而卻一直無法在轉殖植株中，穩定的表現。Haseloff *et al*. (1997) 發現，此乃肇因於綠螢光基因 mRNA 含有一段隱匿的內含子 (cryptic intron)，所以在阿拉伯芥表現時，會因截切 (splicing) 機制的誤認，而移除一段編碼區域，導致轉譯不具功能的綠螢光白質。因此，利用同義突變 (silent mutation) 方式，改變隱匿的內含子截切位點，以解決異常截切問題，即可在轉殖阿拉伯芥中，觀察到改良之 mGFP4 蛋白質的表現，雖然所觀察到的訊號仍較微弱 (Haseloff *et al*. 1997)。陸續有學者以基因工程的技術，改良綠螢光基因，使其激發出不同顏色螢光或是提高螢光激發效率，以符合各種試驗目的之需求 (Heim *et al*. 1994; Heim *et al*. 1995; Heim & Tsien 1996)。其中，以 Yang *et al*. (1996) 利用 F64L、S65T 及 Y145F 三個點突變導入，所發展出強效的綠螢光基因-*EGFP*，最負盛名。目前此基因已是商業化的產品，已被廣泛應用於各種分子生物學和細胞生物學領域相關試驗。除了前述蛋白質工程改良外，學者仍持續自其它水生生物選殖新型的螢光基因，如 *AcGFP*、*AsRED*、*AmCyan*、*ZsYellow*、*ZsGreen* 及 *DsRed* (Matz *et al*. 1999; Lukyanov *et al*. 2000; Labas *et al*. 2002; Matz *et al*. 2002; Gurskaya *et al*. 2003; Chudakov *et al*. 2004; Verkhusha & Lukyanov 2004)。在諸多螢光基因中，*DsRed* 是第一個在植物中表現及應用的 (Jach *et al*. 2001)，而 *AsRed*、*AmCyan*、*ZsYellow*、*ZsGreen* 及 DsRed 等基因，則分別在單、雙子葉植物各種組織中，陸續被表現及觀察 (Wenck *et al*. 2003)。

AcGFP 基因分離自碗水母 (*Aequorea coerulescens*)，可表現出穩定的綠螢光蛋白質 (Gurskaya *et al*. 2003)。其胺基酸序列與前述 EGFP 的序列，具有高度的相似性 (94%)。因此，其光譜性質與螢光強度，皆與EGFP類似，且其在單體 (monomer) 狀態下，即可穩定發出綠螢光，不像 GFP、AvGFP 及 EGFP 等螢光蛋白質，在一般發光環境下常形成雙聚體 (dimer) (Jain *et al*. 2001)，因而更適合應用於蛋白質融合技術 (protein fusion technology)。另一方面，自兔海葵 (*Zoanthus* sp.) 選殖的 *ZsGFP* 基因，可表現較 EGFP 高 2.5 倍強度的綠色螢光 (Matz *et al*. 1999)。然而，目前這兩個強效的螢光基因，仍缺乏詳盡的植物表現資料，而無法應用。

在 1983 年，學者首度利用農桿菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 及合適載體，將微生物基因送入菸草基因體中，並順利表現其性狀 (Fraley *et al*. 1983)，在基因工程研究與應用的領域上，建立一重要的里程碑。水稻是全球近一半人口的主要糧食亦是穀類作物中，基因體最小 (約 420–460 Mb)，且其基因體序列已在 2005 年完成 (IRGSP 2005)。因此，水稻不僅是單子葉植物的模式系統，其基因體功能性研究與轉殖平台，對於植物重要性狀基因的探索與功能分析，扮演著非常重要的角色。

本研究擬針對 *AcGFP* 與 *ZsGFP* 兩強效螢光基因，構築以 *35S* 啟動子驅動之表現系統，繼而轉殖至「台農 67 號」(‘TNG67’) 水稻，觀察這些基因在水稻遺傳背景下的螢光表現情形。最後，利用 *AcGFP* 螢光基因探討玉米 *Ubi-1* 及新選殖胚乳專一表現的啟動子 *GluB5* 與 *GluC* 的活性。所得研究結果，除可協助其它較具挑戰性之植物的轉殖平台的建立，亦可作為相關基因功能與啟動子分析的依據。

材料與方法

試驗材料

本研究以「台農 67 號」作為基因轉殖材料。自田間採取水稻乳熟期的未熟胚 (18 DAP)，誘導癒傷組織，作為基因轉殖材料。試驗所用載體 pUC35SIN (Wu *et al*. 2009) 與 pCAMBIA1300， 及 *A. tumefaciens* EHA105 為中興大學分子生物學研究所陳良築教授所提供。*AcGFP* 與 *ZsGFP* 綠螢光基因分別來自 pAcGFP1 與 pZsGreen (Clontech Co., USA)。而玉米 *Ubi-1* 啟動子片段則來自 pEpyon-42H，

為中興大學生物科技學研究所楊長賢教授所提供。

水稻基因組 DNA 之製備

取 0.1 g 水稻葉片，利用 Tissue Lyser (QIAGEN)，以每秒 1/30 轉震盪 30 s 2 次，進行組織破碎。加入適量的萃取緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM β-mercptoerhanol) 與 200 µg RNase，緩和混合均勻後，於 65℃水浴槽靜置 15 min。接著以 18,516× *g* 離心 10 min，並在加入 5 M 醋酸鉀後，靜置冰上沉澱蛋白質。然後，離心去除沉澱物後，再加入適量 3 M、pH 5.2 的醋酸鈉緩衝液及異丙醇，進行 DNA 沉澱。最後，沉澱的 DNA 再經 70% 酒精洗鹽、乾燥等步驟，回溶於 TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 及 1 mM EDTA, pH 8.0) 並以分光光度計及電泳分析所得 DNA 樣品的品質及濃度，即保存於 -20℃冰箱待用。

「台農 67 號」之胚乳專一性啓動子選殖與綠螢光基因表現系統之構築

胚乳專一性啟動子的選殖部分，依據已發表之水稻 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子序列 (Mitsukawa *et al*. 1998; Kusaba *et al*. 2003)，分別設計 GluB5-F、GluB5-R、GluC-F 及 GluC-R 引子 (表 1)。以「台農 67 號」基因組 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *GluB5* 與 *GluC* 啟動子片段，再以 T-A 選殖方法，次選殖於 pGEM-T Easy vector (PROMEGA)。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體後，分別命名為 pGEMGluB5 及 pGEMGluC。

綠螢光表現系統構築的部分，依據已發表之 *AcGFP* 與 *ZsGFP* 基因序列 (Matz *et al*. 1999; Gurskaya *et al*. 2003)，設計 GFP-F 與 GFP-R 引子 (表 1)。再分別以 pAcGFP1 與 pZsGreen 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *AcGFP* 與 *ZsGFP* 綠螢光基因片段，再分別以 *Mlu*I 及 *Sac*I 限制酶切位，次選殖於 pUC35SIN。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體後，分別命名為 pUC35SAcGFP 及 pUC35SZsGFP。接著，設計 35STGNT-IF-F1 及 35STGNT-IF-R1 引子 (表 1)，再分別以 pUC35SAcGFP 與 pUC35SZsGFP 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *35S* 啟動子 ::*AcGFP*::*NOS* 終止子與 *35S* 啟動子 ::*ZsGFP*::*NOS* 終止子等基因片段，再以 In-Fu-

表 1. 本研究所用的引子及序列。

Table 1. The primers and their sequences used in this work.

Primers	Sequence (5'–3')	Annealing temperature (℃)
GFP-F	GACTACGCGTATGACCATGATTACGCCAAGCT	55
GFP-R	GACTGAGCTCGACTAGTAGGCCTATTATTTGT	55
HGTII-F	ATACACTACATGGCGTGATTTCATA	65
HGTII-R	ACTATCGGCGAGTACTTCTACACAG	65
35STGNT-IF-F1	GGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGT	55
35STGNT-IF-R1	CCATGATTACGAATTCCCGATCTAGTAACATAG	55
Ubi1-F	TGATTACGCCAAGCTTGTGCAGCGTGACCCG	60
Ubi1-R	AACTGCAGCGTCTAGCCCGGGATCCTGCAGAAGTA	60
GluB5-F	CGGCCAGTGCCAAGCTTGAGAAAAGAAGATTTGCTGAC	55
GluB5-R	ACCATGGTGGCGACCGGTACCGGCTATTTATTGAAAGGATAATG	55
GluC-F	CGGCCAGTGCCAAGCTTGTTCAAGATTTATTTTTGGTATTTA	55
GluC-R	ACCATGGTGGCGACCGGTACCAGTTATTCACTTAGTTTCCCACT	55

sion® HD Cloning Kit (Clontech Co., USA)，分別次選殖於 pCAMBIA1300 的 *Eco*RI 及 *Xba*I 限制酶切位。轉形後菌落經 PCR 檢測及電泳分析、定序確認帶有正確啟動子插入片段之重組質體，即分別命名為 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP (圖 1A、B)。啟動子活性分析表現系統之構築，設計 Ubi1-F、Ubi1-R、GluB5-F、GluB5-R、GluC-F 及 GluC-R 引子 (表 1)。分別以 pEpyon-42H、pGEMGluB5 及 pGEMGluC 質體 DNA 為模板，PCR 程式設定為 95℃ 2 min 30 s 1 循環，94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 3 min 循環 30 次，72℃ 10 min 1 循環，增殖出 *Ubi-1*、*GluB5* 與 *GluC* 啟動子片段，再別以 *HindIII* 及 *kpnI* 限制酶切位，分別置換 pCAMBIA-35SAcGFP 的 *35S* 啟動子片段。經定序確認為帶有正確啟動子插入片段之重組質體後，即分別命名為 pCAMBIAUbi1AcGFP、pCAMBIA-GluB5AcGFP 及 pCAMBIAGluCAcGFP (圖 2)。

上述經定序確認後之轉殖載體，均以電穿孔法 (Hood *et al*. 1993) 轉形至 *A. tumefaciens* EHA105，供後續水稻基因轉殖用。

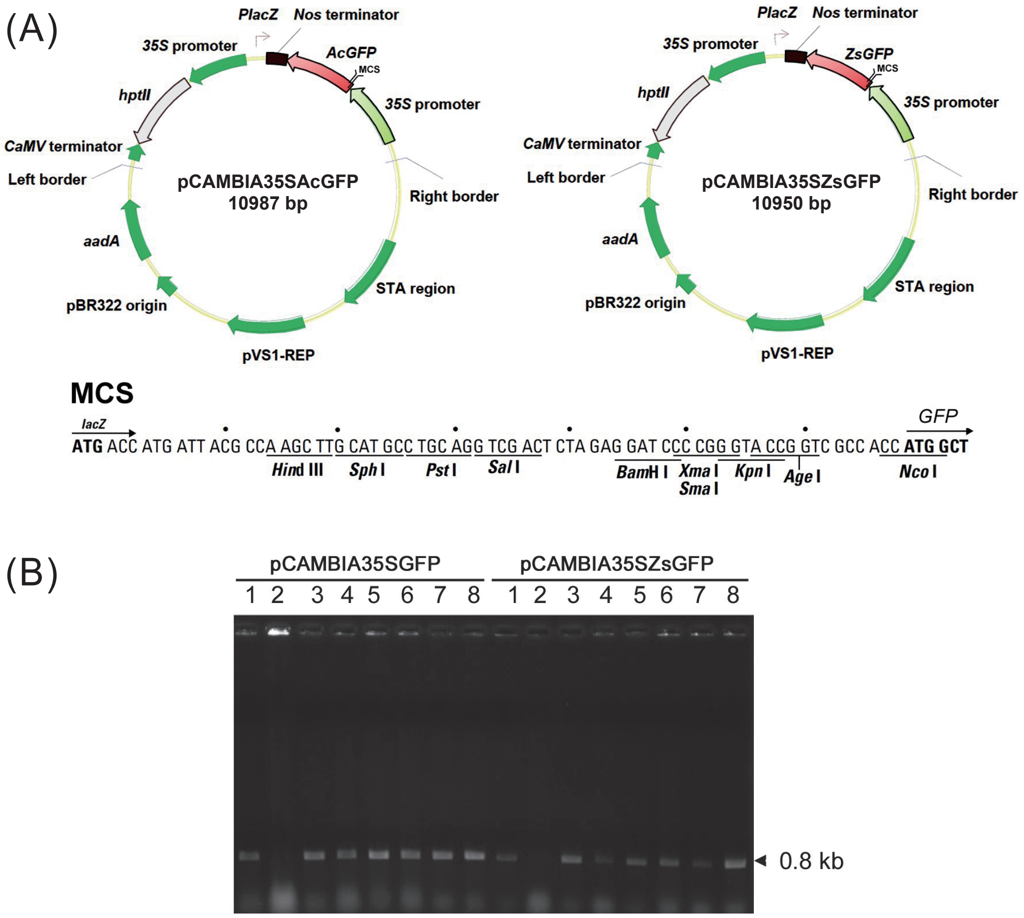

圖 1.　綠螢光基因表現載體系統之建構。(A) pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP 之構築；(B) 利用 colony PCR 確認 GFP 基因存在 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP 農桿菌轉形株中。

Fig. 1.　The development of expression systems of the green fluorescent protein genes. (A) The constructs of pCAMBIA35SAcGFP and pCAMBIA35SZsGFP; (B) Colony PCR analysis of the *Agrobacterium* transformants harbored with pCAMBIA35SAcGFP and pCAMBIA35SZsGFP, respectively.

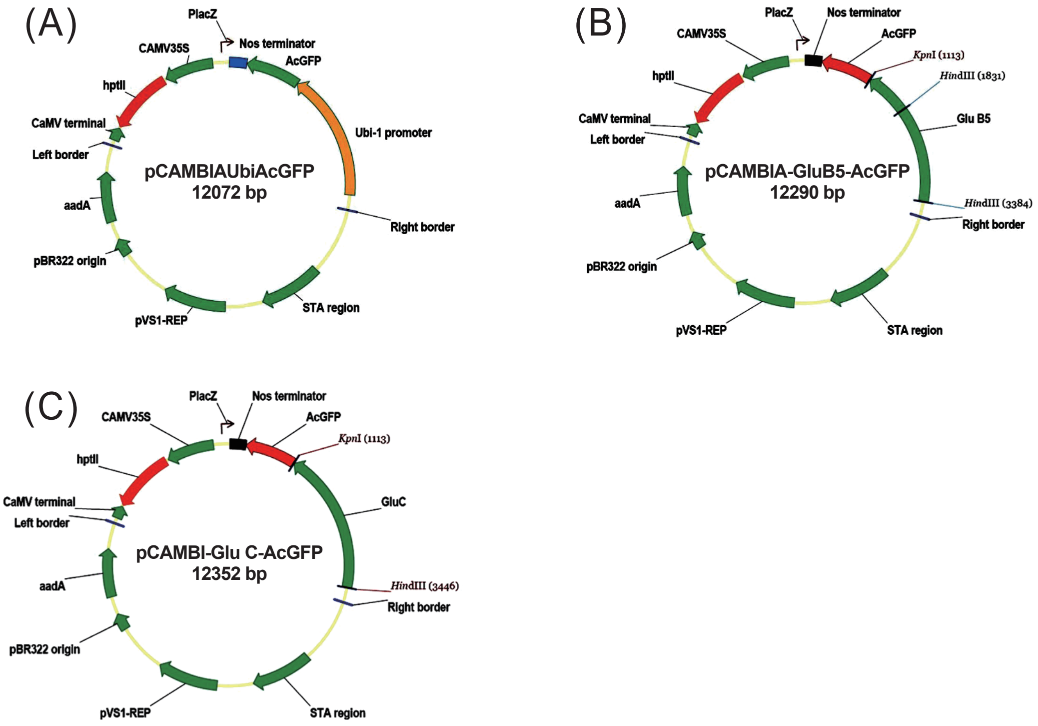

圖 2. 啟動子活性分析之構築。(A) pCAMBIAUbiAcGFP 構築；(B) pCAMBIAGluB5AcGFP 構築；(C) pCAMBIAGluCAcGFP 構築。

Fig. 2. The constructs for the activity analysis of promoters. (A) The construct of pCAMBIAUbiAcGFP; (B) The construct of pCAMBIAGluB5AcGFP; and (C) The construct of pCAMBIAGluCAcGFP.

農桿菌媒介轉形 (*Agrobacterium* mediated transformation)

本研究依中興大學分子生物學研究所陳良築教授所建立的方法 (Wang 2007)，進行水稻的基因轉殖。首先取水稻乳熟期的未熟胚 (約 18 DAP) ，經消毒後，播種於 CIM 固體培養基 (N6 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、0.3 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} 2,4-D、2.2 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7) 。於 30℃全日照下，誘導癒傷組織的生成，以作為轉殖的材料。所得之癒傷組織，進行 *A. tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA35SAcGFP、pCAMBIA35SZsGFP、pCAMBIAUbi1AcGFP、pCAMBIAGluB5AcGFP 及 pCAMBIAGluCAcGFP) 的感染。並依序經由共培養、感染、清洗等步驟後，即置於 2N6-C 固體培養基 (N6 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、2.8 g L^{-1} 脯氨酸、1 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} 2,4-D、2.3 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7) 上，培養 4 d。再移至新的 RSCH 培養基 (MS 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、30 g L^{-1} 山梨糖醇、2 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} Kinetine、0.02 mg L^{-1} NAA、4 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7，消毒後加入 50 mg L^{-1} hygromycin 與 500 mg L^{-1} cefotaxime) 上，於 30℃全日照下，進行再生與篩選。每 2 wk 進行繼代培養，直至癒傷組織出現綠點產生抗性植株，移至 50 mg L^{-1} hygromycin 的 RS medium (MS 鹽類及維生素、30 g L^{-1} 蔗糖、30 g L^{-1} 山梨糖醇、2 g L^{-1} 酪蛋白水解物、2 mg L^{-1} Kinetin、0.02 mg L^{-1} NAA、4 g L^{-1} gelrite 及 pH 5.7，消毒後加入 50 mg L^{-1} hygromycin) 再生試管中，進行健化培養。待植株株高約為 10–20 cm 時，方移出培養試管。擬轉殖株以無菌土栽種於生長箱，進行馴化，待其生長健壯後，便移至溫室待其抽穗結實，分株收集 T_1 種子。

水稻擬轉殖系之綠螢光蛋白質觀察、分子檢測與農藝性狀調查

共培養階段後，癒傷組織於不同培養時間，利用螢光解剖顯微鏡 (Zeiss Stemi SV6, Carl Zeiss)，觀察綠螢光蛋白質表現情形。螢光部分的照射光源為 470–490 nm 的藍光，激發的螢光則經由 505–530 nm 濾鏡過濾後，進入接目鏡呈像。最後，觀測影像再利用數位相機 (Nikon 995) 進行拍攝記錄。

再生後的擬轉殖植株小苗，經馴化 (Acclimation) 後，即移入農業試驗所生物技術組之基因隔離溫室繼續種植，並於不同生育期，觀察轉殖水稻不同組織綠螢光蛋白質表現情形。在最高分櫱期，採取葉片，進行基因組 DNA 製備，並以 DNA 聚合酶鏈鎖反應，分析綠螢光基因的導入情形，並於成熟期，調查株高及分櫱數等農藝性狀，並進行全株拍照記錄，成熟時，單株收穫種子。農藝性狀調查結果，進一步利用 SAS 13.2 統計分析軟體 (SAS Inst. Inc. 2014) 進行完全隨機設計 (complete randomized design; CRD) 之單因子變方分析 (analysis of variance; ANOVA) 及 Fisher 之最小顯著差異性測驗 (Fisher's protected least significant difference test; LSD test)，以比較各轉殖系間在株高與分櫱上的差異。

結果與討論

綠螢光基因表現系統之構築與水稻轉殖

AcGFP 及 *ZsGFP* 兩新型綠螢光基因，自發表及 Clontech Co. 發展為產品至今，仍未在植物系統中被應用。本試驗首先構築 *35S* 啟動子驅動這兩個綠螢光基因之表現系統。其中，表現系統的 *35S* 啟動子及 *NOS* 終止子片段來自於 pUC35SIN 質體，先自 pAcGFP1 與 pZsGreen 質體，分別以 PCR 方法，增殖出 874 bp *AcGFP* 及 850 bp *ZsGFP* DNA 片段，並次選殖於 pUC35SIN，以獲得帶有 *35S* 啟動子 - 綠螢光基因 -*Nos* 終止子的 pUC35SAcGFP 及 pUC35SZsGFP。接著，利用 PCR 分別增殖 *35S* 啟動子-*AcGFP-Nos* 終止子 (2,028 bp) 及 *35S* 啟動子-*ZsGFP-Nos* 終止子 (2,000 bp) 的 DNA 片段，次選殖於 pCAMBIA1300，得到 pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP (圖 1) 。由於 *35S* 啟動子為連續大量表現且無組織專一性的啟動子 (Odell *et al*. 1985)。因此，*35S*::*AcGFP* 及 *35S*::*ZsGFP* 這兩個綠螢光基因表現的構築，應無需任何誘導物，即可在植物的各組織中，表現綠螢光蛋白質。

完成上述構築，並轉形後，利用「台農 67 號」未成熟胚 (圖 3A) 誘導產生的癒傷組織為材料 (圖 3B)，以 *A. tumefaciens* EHA105 (pCAMBIA35SAcGFP 及 pCAMBIA35SZsGFP) 感染水稻癒傷組織 (圖 3C)。經感染的癒傷組織再以 50 mg L^{-1} hygromycin 進行篩選及繼代 (圖 3D 及 E)，直至出現綠點產生抗性植株 (圖 3F)，再轉移至試管培養至 2–3 葉齡階段後 (圖 3G)，即進行健化培養，然後移種至基因隔離溫室種植 (圖 3H)。本試驗初期，以 100 個誘導的癒傷組織作為起始材料，最後分別取得 3 株 *35S*::*AcGFP* 擬轉殖系及 3 株 *35S*::*ZsGFP* 擬轉殖株，轉殖效率約 3–5%。最後以這些轉殖系癒傷組織及植株作為綠螢光基因表現分析的材料。

綠螢光蛋白質之表現與評估

抽取上述擬轉殖系的基因組 DNA，並利用 PCR 分析鑑定轉殖植株。在螢光基因的部分，以 GFP-F 及 GFP-R 引子(表 1)，針對 T_0 世代水稻擬轉殖系進行 PCR 分析，若植株確實為轉殖系，PCR 結果會增殖出約 800 bp 的片段。另外，在抗生素抗性基因 (*HPT*) 部分，以 HGTII-F 及 HGTII-R 引子 (表 1)，針對 T_2 世代水稻擬轉殖系進行 PCR 分析，若植株確實為轉殖系，PCR 結果會增殖出約 556 bp 的片段。結果顯示，3 株系 *35S*::*AcGFP* 及 3 株系 *35S*::*ZsGFP* (T_2 世代) 擬轉殖株皆可偵測出目標螢光基因及抗生素抗性基因的 DNA 片段 (圖 4)，而對照組葉片 DNA 則沒有訊號。由此證明，這些擬轉殖株皆為正確的轉殖系。

在水稻轉形過程，經感染癒傷組織在含有 50 mg L^{-1} hygromycin 的再生培養基上，培養 2 wk 後，*35S*::*AcGFP* 及 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系的癒傷組織在螢光顯微鏡下，即能觀察到可被激發出綠色螢光的癒傷組織 (圖 5)，此結果顯

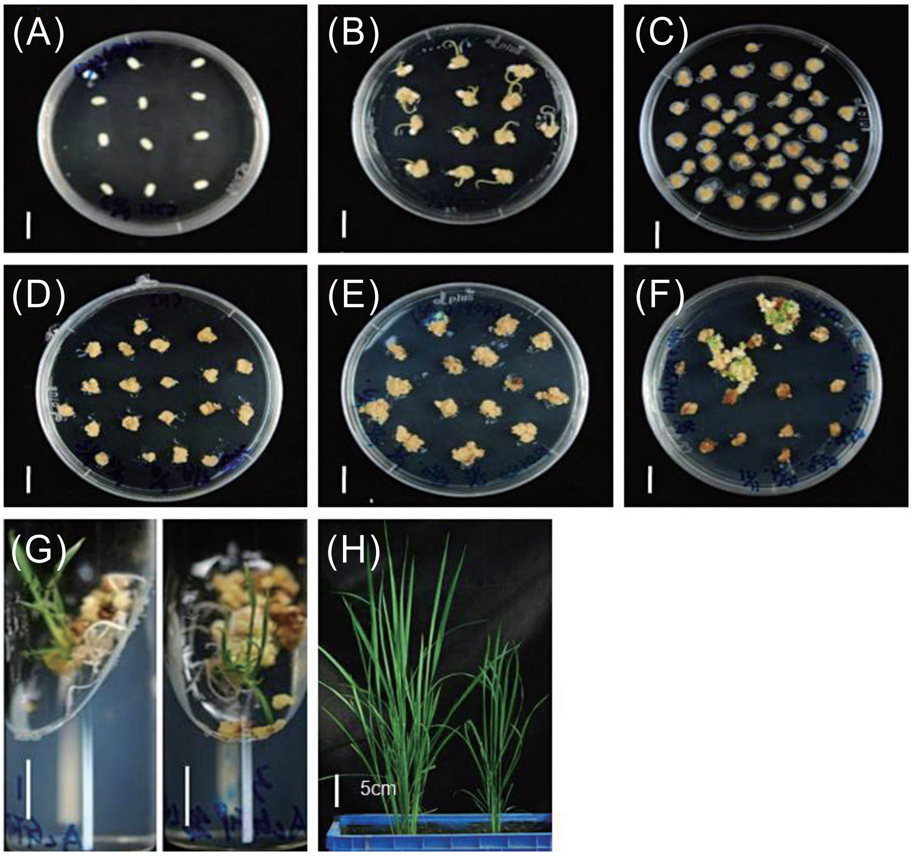

圖 3. 水稻轉殖流程。(A) 未成熟胚癒傷組織誘導；(B) 轉殖用之癒傷組織；(C) 共培養；(D) 及 (E) 篩選及再生；(F) 抗性之癒傷組織出現綠點；(G) 再生成為轉殖植株；(H) 馴化栽種 [(A) 至 (G)，bar = 1 cm；(H)，bar = 5cm]。

Fig. 3. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice. (A) Induction of callus from immature embryos; (B) The calli used as explants; (C) Co-cultivation; (D and E) Selection and regeneration; (F) Resistance calli with the appearance of green point; (G) Regeneration of transgenic plants; and (H) Acclimatization of the regenerated plants (A to G, bar = 1 cm; H, bar = 5 cm).

示這兩基因均可在水稻細胞內正常表現，並具有功能。進一步比較兩螢光蛋白的表現情形，結果發現 *35S*::*AcGFP* 轉殖系的螢光表現的亮度遠強於 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系 (圖 5)。另一方面，收集經 PCR 確認之 T_1 種子，以 2.5% 次氯酸鈉消毒後，播種於 50 mg L^{-1} hygromycin MS 固態培養基。於全光照、30℃下培養 14 d，觀察轉殖系植株之螢光表現情形，結果發現在 *35S*::*AcGFP* 轉殖系苗期的胚盤及根部等組織，具有明顯的螢光表現，而 *35S*::*ZsGFP* 轉殖系則在苗期的胚盤及胚乳表面糊粉層等組織，具有微弱的螢光表現 (圖 5)。結果顯示 *35S*::*AcGFP* 轉殖植株的螢光表現亦強於 *35S*::*ZsGFP* 轉殖植株 (圖 5)。然而，有學者提出 AcGFP 的螢光亮度相當於 EGFP，而 ZsGFP的螢光亮度則相當於2.5倍 EGFP (Matz *et al*. 1999; Gurskaya *et al*. 2003)。前述癒傷組織及 T_1 植株的觀察結果，均與上述與學者的發現有所出入。因此，*35S*::*ZsGFP* 表現系統的低效率表現，仍須進一步的試驗分析，方能釐清是在轉錄或是轉譯層級的調控所造成。

另一方面，*35S*::*AcGF*P 及 *35S*::*ZsGFP*

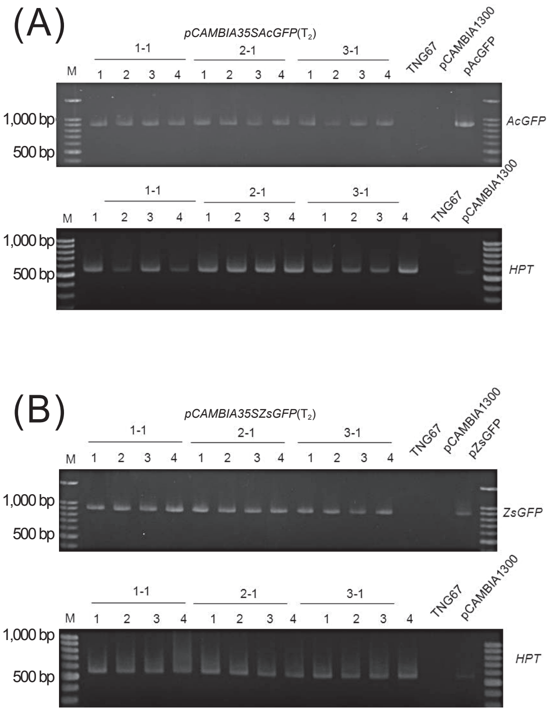

圖 4. 轉殖系螢光基因及抗生素抗性基因之 PCR 分析。(A) *35S::AcGFP* 轉殖系 (T_2)；(B) *35S::ZsGFP* 轉殖系 (T_2)。

Fig. 4. Screening of transgenic lines by PCR analysis of *GFP* and antibiotic resistance genes. (A) *35S::AcGFP* transgenic lines (T_2); (B) *35S::ZsGFP* transgenic lines (T_2).

轉殖系的螢光表現，主要是在癒傷組織、胚盤 (scutellum)、根部或是胚乳表面的糊粉層 (aleurone layer) (圖 5)。但是在芽鞘及幼葉則未觀察到螢光，可能是因為在這些組織綠螢光蛋白質的觀察，受到葉綠素的干擾，而癒傷組織、根部、胚盤及胚乳等部位則因無葉綠素，因此較容易進行觀察。在本試驗中，所用螢光顯微鏡的濾鏡為 505–530 nm，而 AcGFP 及 ZsGFP 綠螢光蛋白質激發的螢光波長，分別為 505 nm 及 506 nm (Matz *et al*. 1999; Gurskaya *et al*. 2003)。所以，後續的實驗應用，或可以利用波長範圍較窄的濾鏡，避免葉綠體的螢光干擾，以改善 AcGFP 及 ZsGFP 綠螢光蛋白質在含葉綠體組織的觀察。

T_2 世代各轉殖系間在株高與分櫱上的差異顯著性分析結果，如表 2 所示，發現 *35S::AcGFP* 3-1 轉殖系之株高與分櫱數皆顯著低於對照品系 ‘TNG67’ 及 pCAMBIA1300 轉殖系，但 *35S::ZsGFP* 2-1 及 3-1 轉殖系的株高則皆顯著高於對照品系 ‘TNG67’，而 *35S::ZsGFP* 3-1 轉殖系的分櫱數也顯著高於對照品系 ‘TNG67’；除了 *35S::ZsGFP* 2-1 外，所有轉殖系的分櫱數亦皆顯著低於 pCAMBIA1300 轉殖系。這些結果可推導綠螢光基

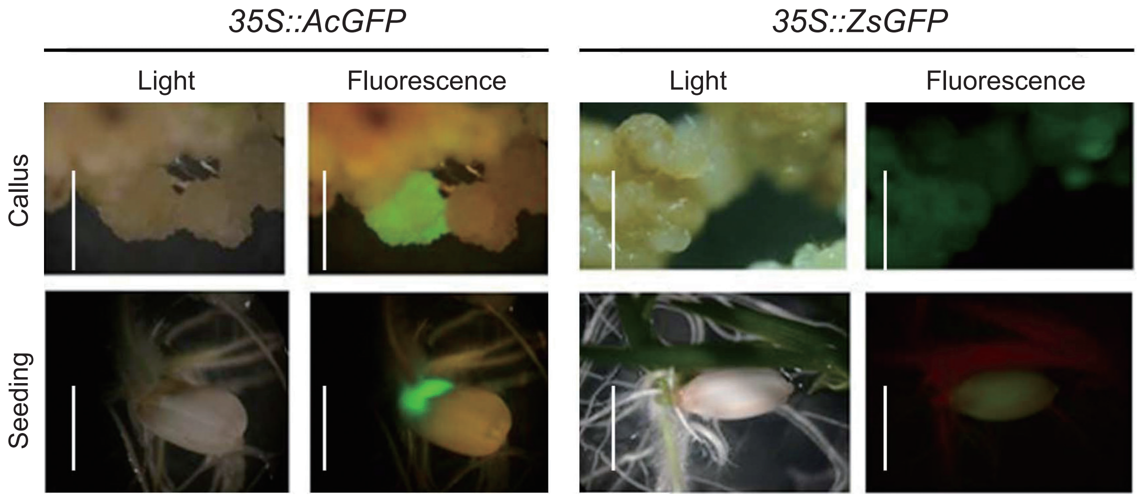

圖 5. 轉殖系之再生癒傷組織及發芽種子的螢光表現情形。

Fig. 5. GFP fluorescence in the regenerated calli and seedlings of transgenic lines. Light and GFP indicate images captured using light and fluorescence microscopy, respectively (Bar = 0.5 cm, n ≧ 3).

表 2. 綠螢光基因轉殖系與對照品系 ‘TNG67’ 農藝性狀之評估。

Table 2. Evaluation of agronomic traits of the green fluorescent protein genes and ‘TNG67’ rice.

Constructs	Line no.	Plant height (cm)	Tillering no. (plant)
35S::*AcGFP*	1-1	120.25 ± 13.30 abc[z]	3.75 ± 1.50 cd
	2-1	111.50 ± 6.24 c	4.50 ± 1.29 cd
	3-1	101.50 ± 1.00 d	3.50 ± 0.58 d
35S::*ZsGFP*	1-1	117.00 ± 5.35 bc	5.00 ± 0.82 cd
	2-1	122.00 ± 3.92 ab	8.75 ± 1.26 ab
	3-1	126.00 ± 3.16 a	7.50 ± 0.58 b
pCAMBIA1300		111.50 ± 3.32 c	9.75 ± 1.89 a
TNG67		112.25 ± 3.77 c	5.25 ± 0.96 c

[z] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.

因 -*AcGFP* 及 *ZsGFP* 基因的導入，確實會造成水稻外表性狀的改變。此現象可能肇因於目標基因片段的插入，造成插入位點基因的破壞或改變其表現，進而導致株高及分櫱數的改變 (即所謂的位置效應)。但此結論仍須進一步將插入位點基因序列選殖出來後，進行功能分析與基因表現分析，方能定論。

綜合上述結果，本研究所構築的綠螢光基因表現系統，除了可在水稻細胞中表現具功能的綠螢光蛋白質外，亦不會因綠螢光蛋白質的產生而影響水稻植株的正常生長。另一方面，本表現系統於構築時，即在啟動子及綠螢光基因區域，設計一多重選殖位置 (multiple cloning site; MCS)， 包 含 *Hin*dIII、*Pst*I、*Sal*I、*Bam*HI、*Sma*I、*Xma*I 及 *Kpn*I 等限制酶切位 (圖 1) ，可供其它重要基因後續在細胞標定 (cell labeling) 、啟動子活性評估 (promoter assay) 或次細胞定位 (subcellular localization) 探討等功能分析試驗。

玉米 *Ubi-1* 及水稻胚乳專一性啓動子活性評估

啟動子可以控制特定基因表現的起始時間、位置和強度，是建構表現系統或生物反應器不可或缺的元件。另一方面，前述實驗發現 *AcGFP* 綠螢光基因在水稻細胞中有極佳的螢光表現。因此，本試驗利用 *AcGFP* 綠螢光基因分析玉米 *Ubi-1* 啟動子及水稻胚乳專一性啟動子 *GluB5* 及 *GluC* 啟動子在水稻細胞中的活性。前者為一連續式表現的強啟動子 (Christensen & Quail 1996)，而後兩者則是胚乳專一性表現的啟動子 (Mitsukawa *et al*. 1998; Kusaba *et al*. 2003)。

先自 pEpyon-42H 質體以 PCR 增殖出 2,028 bp *Ubi-1* 啟動子 DNA 片段，並次選殖於 pUC35SIN，以獲得帶有 *Ubi-1* 啟動子 pUCUbiIN。 再自 pAcGFP1 增殖出 874 bp AcGFP DNA 片段，並次選殖於 pUCUbiIN，以獲得帶有 *Ubi-1* 啟動子 -*AcGFP* 基因 -*Nos* 終止子的 pUCUbiAcGFP 載體。接著，繼續利用 PCR 方法，自 pUCUbiAcGFP 增殖 *Ubi-1-AcGFP-Nos* 之 DNA 片段 (3,170 bp) ，並次選殖於 pCAMBIA1300， 得到 pCAMBIAUbiAcGFP (圖 2A) 。經農桿菌媒介轉形法，將 *Ubi-1*::*AcGFP* 基因片段導入水稻基因組，結果發現除了在感染的癒傷組織中可發現螢光表現外，亦可於再生的芽體發現螢光表現 (圖 6)。經由癒傷組織、再生芽體或根部組織的螢光表現，可發現 *Ubi-1* 啟動子的轉殖系 *Ubi-1*::*AcGFP* 較含 35S 啟動子的轉殖系 *35S*::*AcGFP* 強。上述的觀察結果，均取 3 個以上樣品進行觀察所得之一致性結果，再取具代表的樣品進行拍照記錄。此外，螢光在轉殖系各部位表現，顯示玉米 *Ubi-1* 啟動子為一非組織專一性且為持續表現的強啟動子。

另一方面，依據學者發表的序列設計引子，並以 PCR 方法自水稻「台農 67 號」增殖出 2,280 bp *GluB5* 及 2,340 bp *GluC* 啟動子 DNA 片段，再次選殖於 pGEM-T-Easy 載體

後，進行序列分析，結果發現「台農 67 號」的 *GluB5* 及 *GluC* 啟動子序列，與學者發表的序列具有 100% 的一致性 (Mitsukawa *et al*. 1998; Kusaba *et al*. 2003)。進一步以 PCR 分別自 pGEMGluB5 及 pGEMGluC，增殖出 2,280 bp *GluB5* 及 2,340 bp *GluC* 啟動子片段，並次選殖於 pCAMBIAUbiAcGFP，以置換其上 *Ubi-1* 啟動子片段，而得 pCAMBIA-GluB5AcGFP 及 pCAMBIAGluCAcGFP (圖 2B, C)。接著，利用農桿菌媒介轉形法，分別將 *GluB5*::*AcGFP* 及 *GluC*::*AcGFP* 基因片段導入水稻基因組，結果發現 *GluB5*::*AcGFP* 及 *GluC*::*AcGFP* 轉殖系在感染的癒傷組織、再生芽體、根部組織及胚乳中皆可發現螢光 (圖 6)。因此，藉由螢光的觀察，發現水稻胚乳專一性表現的啟動子並不侷限於胚乳，於癒傷組織、再生芽體、根部組織也都有明顯的表現。同時證明不同啟動子皆能驅動螢光蛋白，並能表現於不同的組織。

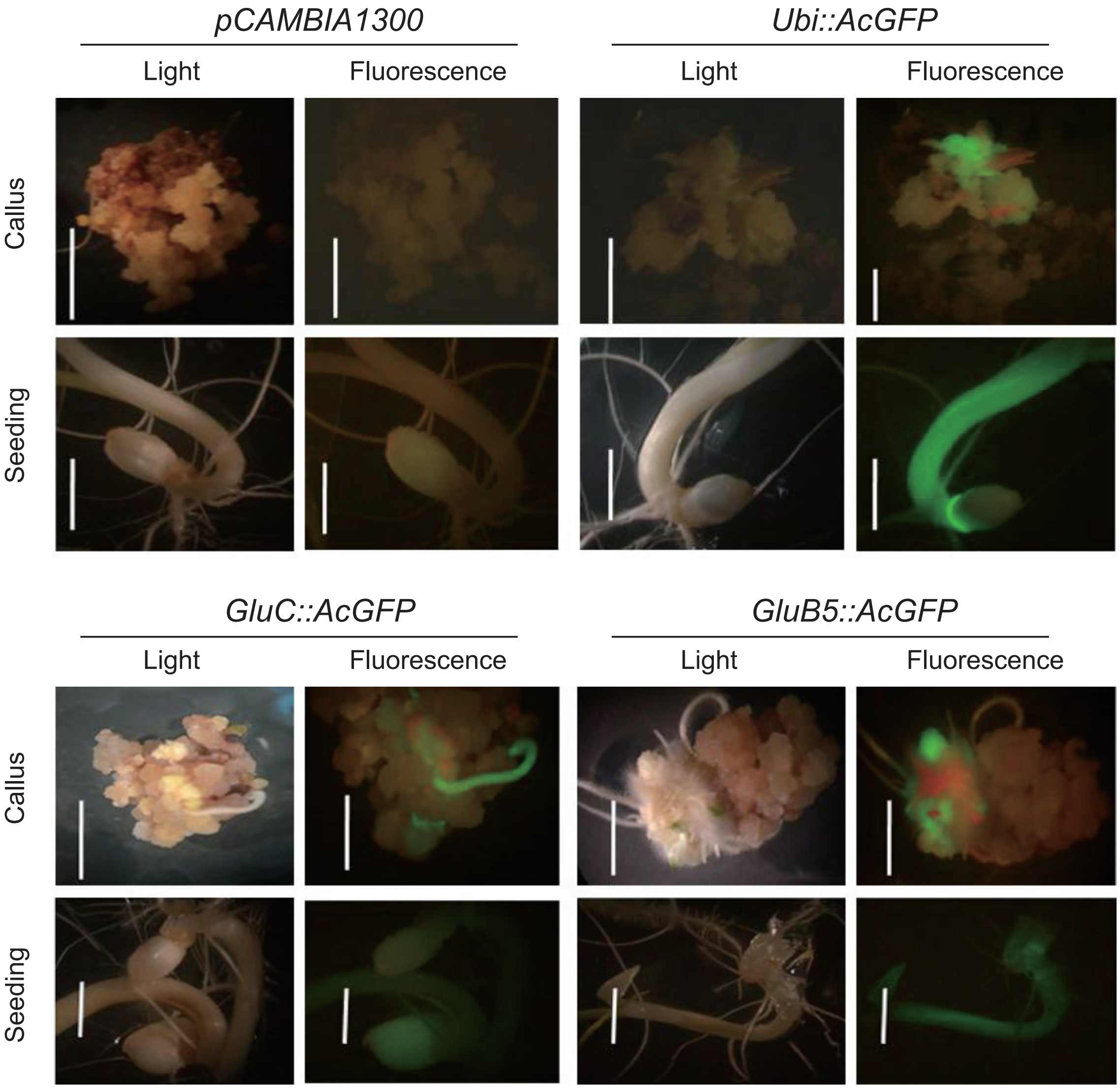

圖 6. 啟動子活性分析轉殖系之再生癒傷組織及發芽種子的螢光表現情形。

Fig. 6. GFP fluorescence in the regenerated callus and seedlings of transgenic lines for promoter (Bar = 0.5 cm, n ≧ 3).

結論

本研究利用 *35S* 啟動子來驅動 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 綠螢光基因，建構植物基因轉殖之報導基因系統，作為建構相關基因表現系統之基礎。由於 *35S* 啟動子具有持續表現的特性，在各組織均能表現螢光 (Odell *et al*. 1985)。因此，可藉由螢光的觀察，提早確認轉殖是否成功，縮短轉殖篩選所需的時間，並減少成本和人力的投入提高整體的轉殖效率。尤其，本研究利用上述兩螢光基因表現系統，於轉殖 2 wk 後，即可經由螢光顯微鏡觀察到經抗生素篩選再生的癒傷組織觀察到綠色螢光。而利用篩選基因 *HPT* (hygromycin phosphotransferase) 基因，來篩選轉殖與非轉殖的植物細胞或組織，得到再生植株後，利用 PCR 檢測確認是否為轉殖植株，要耗費 6–12 wk 才能證實轉殖結果。因此，*AcGFP* 及 *ZsGFP* 綠螢光基因可在水稻細胞中表現具功能的綠螢光蛋白質，確實可縮短篩選所需的時間。此外，本研究進行玉米 *Ubi-1* 及水稻胚乳專一性啟動子 (*GluB5* 及 *GluC*) 活性之比較分析，發現這些啟動子均可在水稻細胞中啟動 *AcGFP* 螢光基因的表現，顯示這些啟動子均能正常驅動異源基因，可應用於其它功能基因表現系統的建構。綜合這些研究成果，本研究建構 *35S* 啟動子驅動 *AcGFP* 及 *ZsGFP* 綠螢光基因及不同啟動子驅動 *AcGFP* 基因等表現系統，可作為植物轉殖的早期篩選標誌，應用於協助較具挑戰性之植物轉殖平台的建立。本研究室已應用這些表現系統，協助建立秈稻及大豆等基因轉殖平台的相關試驗。另一方面，本表現系統於構築時，即在啟動子及綠螢光基因區域間，設計一多重選殖位置，可供日後其它重要基因在細胞標定、啟動子活性評估或次細胞定位置之探討等功能分析之應用。

引用文獻

Bolhassani, A., T. Taheri, Y. Taslimi, S. Zamanilui, F. Zahedifard, N. Seyed, F. Torkashvand, B. Vaziri, and S. Rafati. 2011. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. Exp. Parasitol. 127:637–645.

Christensen, A. H. and P. H. Quail. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. Transgenic Res. 5:213–218.

Chudakov, D. M., V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, E. A. Souslova, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov. 2004. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. Nat. Biotechnol. 22:1435–1439.

Errampalli, D., K. Leung, M. B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee, and J. T. Trevors. 1999. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. J. Microbiol. Meth. 35:187–199.

Fraley, R. T., S. G. Rogers, R. B. Horsch, P. R. Sanders, J. S. Flick, S. P. Adams, M. L. Bittner, L. A. Brand, C. L. Fink, J. S. Fry, G. R. Galluppi, S. B. Goldberg, N. L. Hoffmann, and S. C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803–4807.

Gurskaya, N. G., A. F. Fradkov, N. I. Pounkova, D. B. Staroverov, M. E. Bulina, Y. G. Yanushevich, Y. A. Labas, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov. 2003. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants. Biochem. J. 373:403–408.

Haseloff, J., K. R. Siemering, D. C. Prasher, and S. Hodge. 1997. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2122–2127.

Heim, R., A. B. Cubitt, and R. Y. Tsien. 1995. Improved green fluorescence. Nature 373(6516):663–664.

Heim, R., D. C. Prasher, and R. Y. Tsien. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12501–12504.

Heim, R. and R. Y. Tsien. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. Curr. Biol. 6:178–182.

Hood, E. E., S. B. Gelvin, L. S. Melchers, and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Res. 2:208–218.

Hu, W. and C. L. Cheng. 1995. Expression of Aequorea green fluorescent protein in plant cells. FEBS lett. 369:331–334.

IRGSP. 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature 436:793–800.

Jach, G., E. Binot, S. Frings, K. Luxa, and J. Schell. 2001. Use of red fluorescent protein from Discosoma sp.

(dsRED) as a reporter for plant gene expression. Plant J. 28:483–491.

Jain, R. K., P. B. Joyce, M. Molinete, P. A. Halban, and S. U. Gorr. 2001. Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells. Biochem. J. 360:645–649.

Kusaba, M., K. Miyahara, S. Iida, H. Fukuoka, T. Takano, H. Sassa, M. Nishimura, and T. Nishio. 2003. Low glutelin content1: a dominant mutation that suppresses the glutelin multigene family via RNA silencing in rice. Plant Cell 15:1455–1467.

Labas, Y. A., N. G. Gurskaya, Y. G. Yanushevich, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, S. A. Lukyanov, and M. V. Matz. 2002. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:4256–4261.

Lukyanov, K. A., A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M .L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan, and S. A. Lukyanov. 2000. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. J. Biol. Chem. 275:25879–25882.

Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, and S. A. Lukyanov. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. Nat. Biotechnol. 17:969–973.

Matz, M. V., K. A. Lukyanov, and S. A. Lukyanov. 2002. Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. Bioessays 24:953–959.

Mitsukawa, N., H. Hayashi, K. Yamamoto, K. Kidzu, R. Konishi, T. Masumura, and K. Tanaka. 1998. Molecular cloning of a novel glutelin cDNA from rice seeds. Plant Biotechnol. 15:205–211.

Niedz, R. P., M. R. Sussman, and J. S. Satterlee. 1995. Green fluorescent protein: an *in vivo* reporter of plant gene expression. Plant Cell Rep. 14:403–406.

Odell, J. T., F. Nagy, and N. H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter. Nature 313:810–812.

SAS Institute Inc. 2014. SAS/STAT 13.2 User's Guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 9411 pp.

Sheen, J., S. Hwang, Y. Niwa, H. Kobayashi, and D. W. Galbraith. 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. Plant J. 8:777–784.

Stewart, C. N. 2001. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. Plant Cell Rep. 20:376–382.

Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov. 2004. The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. Nat. Biotechnol. 22:289–296.

Wang, I. W. 2007. Expression of the Pharmaceutical Enzyme L-aminoacylase in Transgenic Rice. Master Thesis, Graduate College of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung. 70 pp. (in Chinese with English abstract)

Wenck, A., C. Pugieux, M. Turner, M. Dunn, C. Stacy, A. Tiozzo, E. Dunder, E. van Grinsven, R. Khan, M. Sigareva, W. C. Wang, J. Reed, P. Drayton, D. Oliver, H. Trafford, G. Legris, H. Rushton, S. Tayab, K. Launis, Y. F. Chang, D. F. Chen, and L. Melchers. 2003. Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. Plant Cell Rep. 22: 244–251.

Wu, Y. Y., Y. R. Chou, C. S. Wang, T. H. Tseng, L. J. Chen, and J. T. C. Tzen. 2009. Different effects on triacylglycerol packaging to oil bodies in transgenic rice seeds by specifically eliminating one of their two oleosin isoforms. Plant Physiol. Biochem. 48:81–89

Yang, T. T., L. Cheng, and S. R. Kain. 1996. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. Nucleic acids Res. 24:4592–4593.

Expression, Evaluation and Application of Novel Green Fluorescent Protein Genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, in Rice

Yi-Wen Wang[1], Hui-Chen Lai[2], Hsiao-Ying Hsieh[2], Chang-Sheng Wang[3,*], and Da-Gin Lin[4,*]

Abstract

Wang, Y. W., H. C. Lai, H. Y. Hsieh, C. S. Wang, and D. G. Lin. 2014. Expression, evaluation and application of novel green fluorescent protein genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, in rice. J. Taiwan Agric. Res. 63(4):307–319.

The aim of this study is to construct novel expression system driving reporter genes, *AcGFP* and *ZsGFP*, for functional evaluation of rice genes. Two constructs, pCAMBIA35SAcGFP and pCAMBIA35SZsGFP, were completed and then introduced into rice genomes by *Agrobacterium*-mediated transformation. The results displayed that the transformed calli of two transgenic lines present green fluorescence after culture for 14 days. The radicles and roots of *35S*::*ZsGFP* lines presented green fluorescence in the seed lings at 14 days after germination. At the same time, the radicles and endosperm aleurone layer of *35S*::*ZsGFP* lines also displayed green fluorescence. However, the coleoptiles and spires of two transgenic lines did not be observed green fluorescence since the interference of chlorophyll fluorescence. The *35S*::*ZsGFP* lines showed stronger fluorescence than those of *35S*::*ZsGFP* since the poor expression efficiency of *35S*::*ZsGFP* system. Finally, *AcGFP* was applied to analyze the activities of maize *Ubi-1*, rice *GluB5* and *GluC* promoters. The results displayed that transformed calli and shoots of *Ubi-1*::*AcGFP* lines could express green fluorescence. The transformed calli and shoots of *GluB5*::*AcGFP* and *GluC*::*AcGFP* lines also expressed green fluorescence. These results suggest that maize *Ubi-1*, rice *GluB5* and *GluC* promoters could drive *AcGFP* and produce functional fluorescent proteins. Therefore, the expression systems established in this study can provide as selectable markers in the initial stages of plant transformation and are applicable in the development of transgenic platforms and functional analysis of plant genes.

Key words: Green fluorescent protein gene, Reporter, Promoter, Expression system, *Agrobacterium*-mediated transformation, Rice.

Received: August 4, 2014; Accepted: October 14, 2014.
[*] Corresponding authors, email: wangchansen@nchu.edu.tw and dagin@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Associate Professor, Department of Agronomy, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.